

1 STRESZCZENIE

Poniższa praca ma na celu zaprezentowanie wstępnych badań efektywności przygotowanych formuacji liposomowych lub lipidowych względem wybranych modeli komórkowych, których zadaniem jest możliwie najlepsze odwzorowanie elementów farmakokinetyki obejmujących dystrybucję substancji lub nośnika w organizmie oraz ewentualne przyszłe zastosowanie. **Głównym założeniem**, w oparciu o które przygotowano zestaw badań, jest istotność procesu endocytozy. Zakłada się, że jest to krytyczny etap w przypadku farmakokinetyki nanofarmaceutyków. Po podaniu doustnym lub dożylnym najważniejszym czynnikiem wpływającym na ilość dostępnej substancji czynnej w docelowym miejscu działania jest eliminacja (ang. *clearance*), związana bezpośrednio z szybkością wycieku leku oraz pobierania samego nanonośnika przez układ fagocytarny (ang. *mononuclear phagocyte system*, MPS). Nośnik po dotarciu do komórek docelowych lub w ich otoczenie, pobierany jest na drodze szlaków endocytotycznych. Możliwość selekcji szlaku endocytotycznego zaangażowanego w internalizację nośnika pozwala na celowanie w określone mechanizmy komórkowe, jak również optymalizację nośnika pod względem wewnątrzkomórkowej dystrybucji substancji czynnej. Ewaluacja farmakokinetyki nanofarmaceutyka *in vitro* wymaga doboru odpowiednich linii komórkowych, które odzwierciedlają krytyczne elementy biodystrybucji, eliminacji czy efektywności w modyfikacji komórek docelowych. Ten ostatni element oceniany jest na podstawie analiz cytotoksyczności, pozwalających na określenie efektywności substancji czynnej, jak również lokalnych parametrów, które muszą być uwzględnione na etapie projektowania nanofarmaceutyka.

Zastosowanie nanonośników pozwala na ograniczenie negatywnych skutków ubocznych stosowanych terapeutyków, co jest szczególnie istotne w przypadku chorób nowotworowych. Jednocześnie niezmiernie ważne jest zachowanie ich skuteczności (aktywności substancji aktywnej). W przypadku antybiotykooporności, koniecznym jest natomiast zastosowanie środków nie posiadających sprecyzowanego celu molekularnego, na które mikroorganizmy mogą uzyskać odporność na drodze mutacji genetycznych. Leczenie szeregu chorób współistniejących, w tym bardzo popularnej anemii, wymaga rozwiązania problemu bolesnych wkluc domięśniowych preparatów żelazowych, przez polepszenie wchłaniania tego pierwiastka z układu pokarmowego. Każdy z tych przypadków musi być rozpatrywany w kontekście najlepszych parametrów farmakokinetycznych, farmakodynamicznych oraz farmakogenetycznych, które powinny stanowić fundament dla prac badawczych zarówno na poziomie badań *in vitro*, jak i *in vivo*.

W pierwszej części pracy przedstawiono nowatorskie podejście do rozwiązania kwestii obecności substancji drażniących w popularnych środkach antyseptycznych zawierających

w swoim składzie **chlorowodorek oktenidyny**. Formulacja przygotowana na bazie lipidu, została przebadana pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej względem bakterii *Escherichia coli*. Następnie wykonano szereg analiz fizykochemicznych popartych dynamiką molekularną, w celu określenia mechanizmu działania substancji aktywnej, których punktem odniesienia była dość dobrze poznana chlorheksydyna. Na tym etapie zastosowanym modelem były odpowiednio przygotowane formułacje liposomowe (neutralne, o składzie 100 mol% POPC oraz ujemnie naładowane, imitujące błonę bakteryjną o składzie 30 mol% DOPG i 70 mol% POPC).

W drugiej części poddano badaniu **formułacje z doksorubicyną**, szeroko stosowanym antybiotykiem z grupy antracyklin, którego aktywność przeciwnowotworowa, jak również szereg efektów ubocznych są dobrze poznane. Wykorzystano do tego celu formułację, której struktura wewnętrzna została usztywniona przez heparynę, na której wykrystalizowano doksorubicynę. Układ ten badany był pod kątem efektywności dostarczania względem wybranych szlaków endocytotycznych, na bazie: w pierwszej kolejności badań mikroskopowych z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej, a następnie w oparciu o badania biologii molekularnej, w tym *real-time PCR* oraz metodę Western Blot. Celem tych badań było określenie szlaków endocytotycznych zaangażowanych w proces pobierania nanoagregatów w największym stopniu. W kolejnym kroku wykonano analizy cytotoksyczności przygotowanych preparatów względem komercyjnego leku Caelyx®. Wykorzystane modele pozwoliły na odwzorowanie grup komórek docelowych po podaży dożylniej, dla doksorubicyny (makrofagi, rak piersi oraz rak wątroby).

W trzeciej części przygotowano **zestaw preparatów liposomowych na bazie soli żelaza (nieorganicznej, organicznej oraz kompleksu)**, które zostały przeanalizowane pod kątem efektywności zamykania, cytotoksyczności względem linii komórkowej raka jelita grubego (standardowego modelu stosowanego w badaniach nad podażą doustną) oraz generowania reaktywnych form tlenu, co jest głównym efektem ubocznym związanym z suplementacją żelaza.

Wszystkie badania cytotoksyczności czy aktywności przeciwdrobnoustrojowej przeprowadzone zostały zgodnie z odpowiednimi założeniami normatywnymi, w tym Księgą Jakości Laboratorium Ośrodka Badawczo-Rozwojowego Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego.

Uzyskane wyniki świadczą o szerokim potencjale nanonośników liposomowych oraz lipidowych, do modyfikacji farmakokinetyki i farmakodynamiki charakteryzowanych w pracy substancji czynnych. Odpowiednia modyfikacja formułacji umożliwia uzyskanie

terapi celowanej, w oparciu o dobór właściwości fizykochemicznych nanofarmaceutyka oraz daje szerokie możliwości ich wykorzystania.

Kamila
Moral-Paluch
15.11.2020